

(6). – P. 536–539.

19. Antimicrobial potential of Glycyrrhiza glabra roots / V. K. Gupta [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2008. – № 116 (2). – P. 377–380.

20. Antifungal activity of Glycyrrhiza glabra extracts and its active constituent glabridin / A. Fatima [et al.] // Phytother Res. – 2009. – № 23 (8). – P. 1190–1193.

Адрес для корреспонденции:

100015, Республика Узбекистан,
г. Ташкент, Мирабадский район, пр. Ойбека 45,
Ташкентский фармацевтический институт,
кафедра фармацевтической химии,
e-mail: kamila-muhitdinova@mail.ru,
Мухитдинова К.Ш.

Поступила 22.02.2019 г.

М. В. Яцко, В. И. Фадеев, М. Л. Пивовар

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИЛДЕНАФИЛА ЦИТРАТА
В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ**

**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

Целью настоящей работы являлась валидация простой и доступной методики количественного определения силденафила цитрата в плазме крови кроликов. В качестве внутреннего стандарта в методике использован пропилпарабен, определены оптимальные условия хроматографического определения силденафила цитрата. Разработанная методика пробоподготовки включает экстракцию аналита и внутреннего стандарта этилацетатом, упаривание экстракта в токе азота и перерастворение веществ в подвижной фазе. Хроматографический анализ полученных проб осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent 1100. В качестве хроматографической колонки использовали ZORBAX SB-C18 (4,5 × 150 мм, 5 мкм), подвижная фаза ацетонитрил-фосфатный буферный раствор (55:45, об/об). Разработанная методика валидирована по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, робастность (устойчивость стандартных растворов и стабильность образцов в условиях трехкратной разморозки-заморозки), диапазон применения.

Ключевые слова: силденафил, плазма, кровь, доклинические испытания, жидкость-жидкостная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Силденафил (1-[[3-(6,7-Дигидро-1-метил-7-оксо-3-пропил-1Н-пиразоло[4,3-альфа]пиримидин-5-ил)-4-этоксифенил]сульфонил]пиперазина цитрат) – селективный ингибитор цГМФ-специфической фосфодиэстеразы типа 5, которая ответственна за распад цГМФ в пещеристом теле [1].

Существует большое количество методик определения данного вещества. Например, в статье [2] анализ плазмы крови проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-10AD со спектрофотометрическим детектированием при 230 нм с использованием колонки Kromasil C4 (4,6 × 150 мм, 5 мкм). В качестве под-

вижной фазы использовалась смесь ацетонитрила 500 ммоль/л и фосфатного буферного раствора, содержащего 10 ммоль/л диэтиламина гидрохлорида (32:68).

В работе [3] предложена методика определения силденафила и его метаболита в плазме крови методом ВЭЖХ с использованием электрохимического детектирования. Колонка Hypersil C8 (4,6 × 150 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил, метанол, фосфатный буферный раствор в объемном соотношении 18,5:34,5:47,0 (pH = 7,68; об/об/об). В качестве внутреннего стандарта использовался рокситромицин.

Группой авторов [4] выполнялось определение силденафила на хроматографе Agilent 1100 со спектрофотометриче-

ским детектором (длина волны детектирования 230 нм), колонкой C18 InersilODS2 и подвижной фазой ацетонитрил и фосфатный буферный раствор (47:53, об/об). В качестве внутреннего стандарта использовался бутилпарабен.

В работе [5] силденафила цитрат определяли методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием при длине волны 240 нм. Разделение осуществляли на колонке Bondapak C18 (3,9 × 300 мм, 10 мкм) с подвижной фазой, содержащей ацетат аммония (pH = 7,0; 0,2 М) и ацетонитрил (1:1, об/об).

Группа авторов [6] проводила исследование силденафила на колонке Inertsil C18 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) с использованием подвижной фазы ацетонитрил / фосфатный буфер (70:30, об. / об., pH = 7,0) с УФ-детектированием при 228 нм.

Кроме перечисленных, имеется ряд публикаций [7-11], посвященных количественному определению силденафила в биологических жидкостях с использованием ВЭЖХ-МС/МС методов и применением различных видов внутренних стандартов.

В имеющихся методиках не обоснован выбор подвижной фазы и внутреннего стандарта, использующиеся материалы (колонки и внутренние стандарты) зачастую труднодоступны. Кроме того, в указанных статьях приведены методики определения силденафила цитрата в биологических жидкостях человека, а сведения о возможности применения данных методик для определения силденафила в биологических жидкостях лабораторных животных отсутствуют.

Целью настоящей работы являлась валидация простой и доступной методики

количественного определения силденафила цитрата в плазме крови кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При разработке методики использовались весы аналитические Radwag AS 60/220/60/C/N/2, pH-метр Hanna HI2211-02, механические одноканальные дозаторы Gilson P200 и P1000, лабораторная посуда, соответствовавшая ГОСТ 1770-74 и ГОСТ 29227-91.

Хроматографический анализ выполняли на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent, США) со специализированной системой управления, сбора и обработки данных «OpenLab», оснащенном детектором на основе диодной матрицы.

В работе также использовали следующие стандартные образцы и реактивы:

- стандартный образец силденафила цитрата (Supelco, PHR1807);
- калий фосфорнокислый однозамещенный (Sigma-Aldrich, 795488);
- ацетонитрил для хроматографии (Carlo Erba, L042879K);
- натрия гидроксид (ЧДА);
- этилацетат (Sigma-Aldrich, 270989);
- стандартный образец пропилпарабена (Supelco, PHR1010);
- воду для хроматографии.

Структурная формула силденафила представлена на рисунке 1. Это белый или почти белый кристаллический порошок, мало растворим в метаноле, легко растворим в диметилформамиде. Растворимость в воде 3,5 мг/мл. Теоретически рассчитанный $\log P$ варьирует от 1,65 [12] до 2,35 [13] в зависимости от источника; $pK_a = 7,27$; $pK_{BH}^+ = 5,97$ [13].

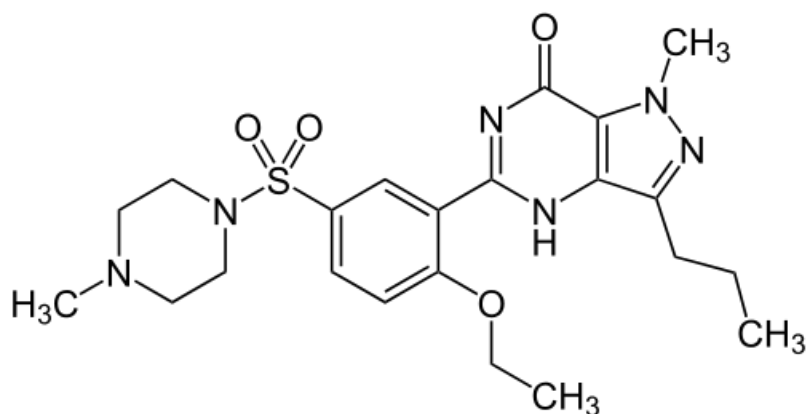


Рисунок 1. – Структурная формула силденафила

Методика определения силденафила в плазме крови кроликов валидирована по следующим валидационным характеристикам и показателям точности:

- специфичность;
- линейность;
- прецизионность;
- правильность;
- диапазон применения;
- робастность [14-16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из полученных ранее экспериментальных данных, было установлено, что наиболее оптимальным экстрагентом для извлечения силденафила из водных растворов [17] и биоматериала [18] является этилацетат.

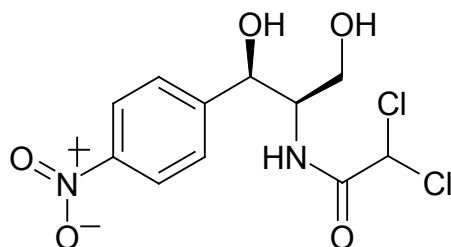


Рисунок 2. – Структурная формула хлорамфеникола

Оба приведенных вещества в условиях пробоподготовки практически в равной степени извлекались из биоматериала. Однако при разработке методики хроматографического определения силденафила было установлено, что для разделения хлорамфеникола и силденафила оптимальной подвижной фазой являлся ацетонитрил-изопропанол-фосфатный буферный раствор (10:13:77, об/об/об) [18], а для пропилпарабена и силденафила – ацетонитрил-фосфатный буферный раствор (55:45, об/об). Вследствие более простого состава подвижной фазы во втором случае в качестве внутреннего стандарта был выбран пропилпарабен.

Таким образом, полученная в результате проведенных исследований методика количественного определения силденафила цитрата в плазме крови кроликов имела следующий вид: 500 мкл плазмы крови кроликов помещают в микроцентрифужную пробирку (эппендорф), прибавляют 300 мкл рабочего раствора вну-

важным фактором определения вещества в биологическом объекте является выбор внутреннего стандарта, обладающего близкими к определяемому веществу свойствами. В данном случае использование молекул силденафила, меченных тяжелыми изотопами, является наилучшим вариантом, однако он характеризуется высокой стоимостью стандартного образца субстанции и неэффективен при использовании диодно-матричного детектора. В связи с этим был проведен поиск веществ, близких по физико-химическим свойствам к силденафилу и в то же время максимально доступных.

Предварительный скрининг позволил выявить два вещества-кандидата: хлорамфеникол (левомицетин) (рисунок 2) и пропилпарабен (рисунок 3).

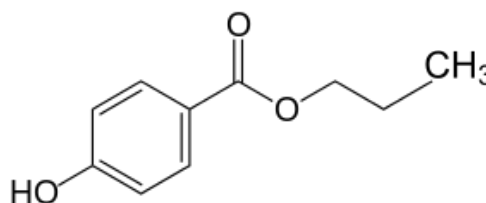


Рисунок 3. – Структурная формула пропилпарабена

тренного стандарта и перемешивают на мульти-вортке в течение 3 минут. К полученному раствору прибавляют 1000 мкл этилацетата и перемешивают на мульти-вортке в течение 5 минут. Пробу центрифугируют в течение 10 минут при 12000 об/мин. Отбирают верхний слой в микроцентрифужную пробирку (эппендорф) и упаривают при температуре 60 °C в токе азота. К упаренной пробе прибавляют 100 мкл подвижной фазы, обрабатывают ультразвуком в течение 1 минуты, центрифугируют 5 минут и переносят супернатант во вставку объемом 100 мкл для виалы.

Хроматографический анализ полученных проб осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent 1100. Для разделения веществ использовали широко распространенные хроматографические колонки, заполненные силикагелем с привитыми октадецильными группами, ZORBAX SB-C18 (4,5 × 150 мм, 5 мкм), подвижная фаза ацетонитрил-фосфатный

буферный раствор (55:45, об/об). Типовая хроматограмма приведена на рисунке 4. Концентрацию силденафила цитрата в объекте определяли по методу градуировочного графика.

При оценке специфичности методики установлено, что на хроматограмме, полученной при анализе образца плазмы крови кроликов, не содержавшего силденафила цитрат, не обнаружено хроматографических пиков (с соотношением сигнал/шум более 3) со временем удерживания, соответствовавшим временам

удерживания аналита и внутреннего стандарта. Разрешение между пиком силденафила и любыми соседними пиками (с соотношением сигнал/шум более 3) превышало 2,0.

Выбор диапазона концентраций градуировочного графика осуществляли исходя из усредненной (экспериментально определенной) концентрации силденафила в плазме крови кроликов и составил от 12,5 % до 300 % от среднего (0,80 мкг/мл). Полученный градуировочный график изображен на рисунке 5, результаты оцен-

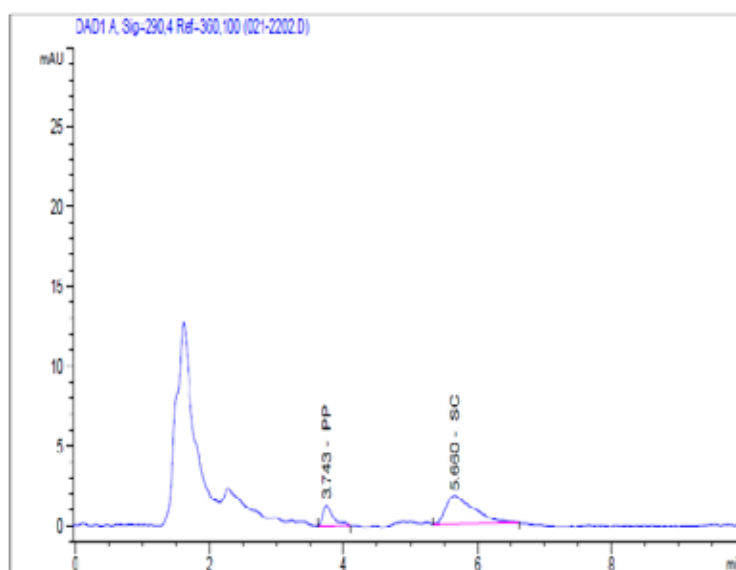


Рисунок 4. – Хроматограмма образца плазмы крови кролика, содержащей силденафила цитрат ($t_R = 5,66$ мин.) и пропилпарабен ($t_R = 3,74$ мин.)

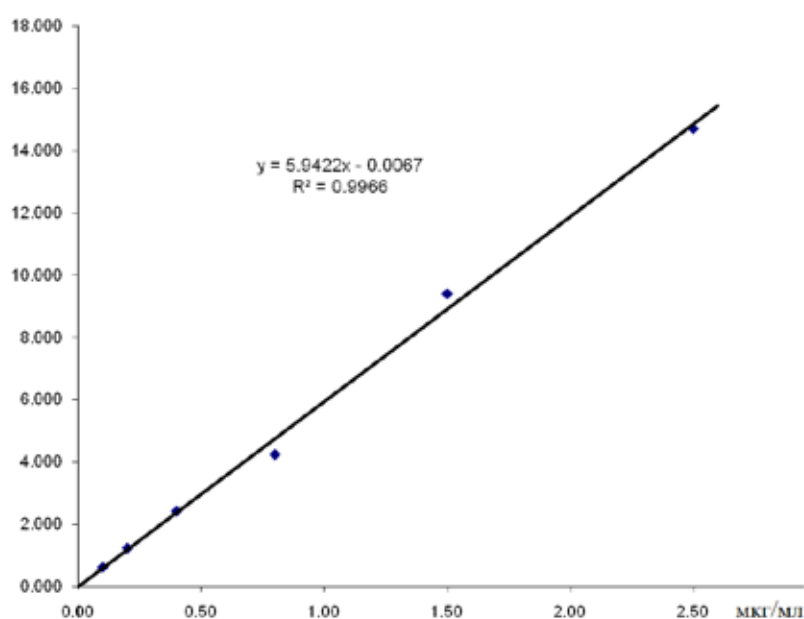


Рисунок 5. – Градуировочный график для теста «Линейность»

ки линейности градуировочного графика приведены в таблице 1.

Отклонение от определяемой концентрации для всех точек градуировочного графика составляет от 1,0 % до 10,5 %, величина свободного члена в уравнении составляет 6,9 % от величины аналитического сигнала. Рассчитанные значения t -критерия Стьюдента для оценки смещения среднего значения для четырех концентраций градуировочного графика на-

ходятся в диапазоне 0,653–1,095, что не превышает $t_{\text{крит}}(5, 0,95) = 2,776$. Всё перечисленное соответствует критериям приемлемости [15–16].

Таким образом, методика обладает удовлетворительной избирательностью и линейна в диапазоне концентраций от 0,10 до 2,50 мкг/мл.

Результаты валидации методики по остальным валидационным характеристикам приведены в таблице 2.

Таблица 1. – Критерии приемлемости и результаты валидации для теста «Линейность»

Оцениваемый параметр и критерий приемлемости	Результаты
Коэффициент корреляции R должен быть не менее 0,995	0,998
Открываемость (R) для всех точек должна быть в пределах 85-115 % (в области нижней границы определяемых содержаний 80-120 %). Определяемая концентрация 0,10 мкг/мл 0,20 мкг/мл 0,40 мкг/мл 0,80 мкг/мл 1,50 мкг/мл 2,50 мкг/мл	Открываемость: 107,1 % 105,2 % 102,3 % 110,5 % 105,5 % 101,0 %
Величина (Y) свободного члена градуировочного графика не должна превышать 30 % от величины аналитического сигнала нижней точки градуировочного графика	6,9 %
Смещение среднего значения определяемой величины не должно быть статистически значимым (по t – критерию; $t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}}(5, 0,95) = 2,776$) 0,1 мкг/мл 0,4 мкг/мл 0,8 мкг/мл 1,5 мкг/мл	Значения t -критерия: 0,653 1,095 0,993 1,742

Таблица 2. – Критерии приемлемости и результаты валидации по показателям «Прецизионность», «Правильность» и «Робастность»

Оцениваемый параметр	Оцениваемая концентрация вещества	Результат	Критерий приемлемости
Прецизионность	0,1 мкг/мл 0,4 мкг/мл 0,8 мкг/мл 1,5 мкг/мл	Относительное стандартное отклонение (RSD):	
		8,5 %	не более 20,0 %
		3,1 %	не более 15,0 %
		4,9 %	не более 15,0 %
		6,0 %	не более 15,0 %
Правильность	0,1 мкг/мл 0,4 мкг/мл 0,8 мкг/мл 1,5 мкг/мл	Открываемость:	
		94,5 %	должна быть в пределах 85-115 %
		96,9 %	(в области нижней границы определяемых содержаний – в
		96,9 %	пределах 80-120 %)
		95,3 %	
Робастность (дополнительные циклы замораживания / размораживания проб):	0,1 мкг/мл 0,1 мкг/мл 0,1 мкг/мл	Величина аналитического сигнала:	
			не должна отклоняться более чем на 15 % [15, 16] в области нижней границы определяемых содержаний (соответствие критерию $85,0 < R < 115,0$)
		109,5	
		106,4	
		96,0	

При оценке правильности установлено, что открываемость находилась в пределах 94,5-96,9 %, что соответствует критериям приемлемости. Максимальное RSD методики составляет 8,5 % в диапазоне концентраций 0,10 – 1,50 мкг/мл, диапазон применения находится в пределах от 0,10 до 2,50 мкг/мл.

В результате изучения устойчивости образцов к циклам замораживания-размораживания доказана возможность трехкратного размораживания образцов плазмы крови кроликов (с последующим замораживанием остатков) без потери анализируемого вещества, что свидетельствует о робастности методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Валидирована методика количественного определения силденафила цитрата в плазме крови кроликов по показателям «Специфичность», «Линейность», «Правильность», «Прецизионность», «Робастность». Доказано, что методика специфична, так как на хроматограмме образца, не содержащего силденафила цитрат, не обнаружено мешающих его определению пиков. Установлено, что методика линейна в диапазоне концентраций от 0,10 до 2,50 мкг/мл. Максимальное RSD методики составляет 8,5 % в диапазоне концентраций 0,10 – 1,50 мкг/мл, что указывает на ее прецизионность. Открываемость силденафила цитрата составляет 94,5–96,9 %, что свидетельствует о ее правильности. Доказана устойчивость образцов плазмы крови кроликов к трем циклам заморозки-разморозки, что подтверждает робастность методики.

SUMMARY

M. V. Yatsko, V. I. Fadeev, M. L. Pivavar
VALIDATION OF THE METHOD
FOR DETERMINING SILDENAFIL
CITRATE IN RABBIT BLOOD PLASMA

The purpose of this work was to validate a simple and available assay method of sildenafil citrate in blood plasma. Propylparaben was used as an internal standard in the method and the optimum conditions for the chromatographic determination of sildenafil citrate were determined. The developed sample preparation method includes the extraction of the analyte sample and the

internal standard by ethyl acetate, evaporation of the extract in the nitrogen stream and re-dissolution of substances in the mobile phase. The chromatographic analysis of the obtained samples was carried out on a liquid chromatograph Agilent 1100. ZORBAX SB-C18 (4,5 × 150 mm, 5 μm) was used as a chromatographic column, and the mobile phase was acetonitrile-phosphate buffer solution (55:45, v/v). The developed method was validated according to the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, robustness (stability of standard solutions and stability of samples under conditions of triple defrosting-freezing activity) and the range of application.

Keywords: sildenafil, plasma, blood, pre-clinical tests, liquid-liquid extraction, high-performance liquid chromatography.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction / M. Boolell [et al.] // *Int. J. Impot. Res.* – 1996. – Vol. 8, № 2. – P. 47–52.
2. Min, D. I. Determination of Sildenafil Citrate in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography and a Case for the Potential Interaction of Grapefruit Juice With Sildenafil Citrate / D. I. Min, L. Miyoung // *Therapeutic Drug Monitoring.* – 2001. – Vol. 23, № 1. – P. 21–26.
3. Al-Ghazawi, M. Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study / M. Al-Ghazawi, M. Tutunji // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2007. – Vol. 43 – P. 613–618.
4. Coffferdo, B. M. Reverse-phase high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of sildenafil and N-demethyl sildenafil in plasma of children / M. B. Coffferdo, S. Cairol, A. Vitale // *Biomedical Chromatography.* – 2016. – Vol. 30, № 12. – P. 2070–2073.
5. Daraghme, N. Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC / N. Daraghme, M. Al-Omari // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2001. – Vol. 25. – P. 483–492.
6. Prasanna, B. Validation and stability

indicating RP-HPLC method for the determination of sildenafil citrate in pharmaceutical formulations and human plasma / B. Prasanna, Y. Ramanjaneya // *E-Journal of Chemistry*. – 2008. – Vol. 5. – P. 1117–1122.

7. Comparison of fasting bioavailability among 100-mg commercial, 100-mg generic, and 50-mg chewable generic sildenafil tablets in healthy male mexican volunteers: a single-dose, 3-period, crossover study / G. Marcelín-Jiménez [et al.] // *Clinical Therapeutics*. – 2012. – Vol. 34, № 3. – P. 689–698.

8. Alkharfy, K. V. Simple and sensitive LC-ESI-MS method for the quantitation of sildenafil in plasma samples / K. V. Alkharfy // *Journal of Separation Science*. – 2009. – Vol. 32, № 22. – P. 3866–3870.

9. An *in vitro* and *in vivo* comparative study of directly compressed solid dispersions and freeze dried sildenafil citrate sublingual tablets for management of pulmonary arterial hypertension / R. Zayed [et al.] // *Acta Pharmaceutica*. – 2012. – Vol. 62, № 3. – P. 411–432.

10. Johnson, R. D. Identification of sildenafil (Viagra®) and its metabolite in six aviation fatalities / R. D. Johnson, R. J. Lewis // *Federal Aviation Administration*. – Washington, 2006. – 11 p.

11. Sildenafil and N-desmethyl sildenafil quantification in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS detection: Application to bioequivalence study / B. R. Challa [et al.] // *Analytical Methods*. – 2010. – Vol. 2, № 8. – P. 1043–1050.

12. CID 5281023 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281023>. – Дата доступа: 25.05.2019.

13. Sildenafil [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00203#reference-F3856>. – Дата доступа: 25.05.2019.

14. Государственная фармакопея Республики Беларусь: (ГФ РБ II) : разраб. на основе Европейской Фармакопеи : в 2 т. : введ. в действие с 1 июля 2016 г. приказом М-ва здравоохранения Республики Беларусь от 31.03.2016 г. № 270 Т. 2 : Контроль

качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / Александрова Н. В., Алексеев Н. А., Бернович Л. С., Бузук А. Г., Бузук Г. Н. [и др.] ; М-во здравоохранения Республики Беларусь, РУП "Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении" ; [под. общ. ред. С. И. Марченко]. Молодечно : Победа. 2016. – 1367 с.

15. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.

16. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – London, 2009. – 17 p.

17. Васильчук, И. А. Изучение влияния природы органических растворителей и pH раствора на экстракцию силденафила цитрата / И. А. Васильчук, М. В. Баранова, М. Л. Пивовар // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 68-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых / Витебск. гос. мед. ун-т. – Витебск, 2016. – С. 380–381.

18. Фадеева (Баранова), М. В. Разработка методики определения силденафила цитрата в плазме крови / М. В. Фадеева (Баранова), М. Л. Пивовар // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 69-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых / Витебск. гос. мед. ун-т. – Витебск, 2017. – С. 687–688.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. моб.: +375-29-711-39-57,
e-mail: mikle_n@tut.by,
Пивовар М.Л.

Поступила 28.05.2019 г.